

**POLYMERS FOR SEPARATION OF BIOMOLECULES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS****Publication number:** JP9504375T**Publication date:** 1997-04-28**Inventor:****Applicant:****Classification:****- international:** C08F20/52; C08F26/10; C08F122/38; C08F126/10; C08G63/06; C08G63/08; G01N27/447; C08F20/00; C08F26/00; C08F122/00; C08F126/00; C08G63/00; G01N27/447; (IPC1-7): G01N27/447; C08F122/38; C08F126/10; C08G63/08; G01N27/447**- european:** G01N27/447B8; G01N27/447B6**Application number:** JP19940516796T 19941206**Priority number(s):** US19930170078 19931217; WO1994US13852 19941206**Also published as:** WO9516911 (A1)  
 WO9516910 (A1)  
 EP0734521 (A1)  
 US5567292 (A1)  
 EP0734521 (A0)  
 EP0734521 (B1)  
 DE69432267T (T2)  
 AU677495B (B2)

less &lt;&lt;

**Report a data error here**

Abstract not available for JP9504375T

Abstract of corresponding document: WO9516911

The invention provides uncharged water-soluble silica-adsorbing polymers for suppressing electroosmotic flow and to reduce analyte-wall interactions in capillary electrophoresis. In one aspect of the invention, one or more of such polymers are employed as components of a separation medium for the separation of biomolecules, such as polynucleotides, polysaccharides, proteins, and the like, by capillary electrophoresis. Generally, such polymers are characterized by (i) water solubility over the temperature range between about 20 DEG C to about 50 DEG C, (ii) concentration in a separation medium in the range between about 0.001 % to about 10 % (weight/volume), (iii) molecular weight in the range of about  $5 \times 10^3$  to about  $1 \times 10^6$  daltons, and (iv) absence of charged groups in an aqueous medium having pH in the range of about 6 to about 9. In one embodiment, polymers of the invention are selected from the group consisting of poly lactams, such as polyvinylpyrrolidone; N,N-disubstituted polyacrylamides; and N-substituted polyacrylamides. In accordance with the method of the invention, a sufficient amount of polymer adsorbs to the capillary surface to establish a zone of high viscosity that shields the analyte from the wall and impedes the movement of an electrical double layer under an electric field.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-504375

(43) 公表日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	
G 0 1 N 27/447		0275-2J	G 0 1 N 27/26	3 1 5 F
C 0 8 F 122/38	MNC	7824-4J	C 0 8 F 122/38	MNC
126/10	MNN	7824-4J	126/10	MNN
C 0 8 G 63/08	NLP	8933-4J	C 0 8 G 63/08	NLP
		0275-2J	G 0 1 N 27/26	3 1 5 K

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 50 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-516796  
 (86) (22) 出願日 平成6年(1994)12月6日  
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)6月17日  
 (86) 国際出願番号 PCT/US94/13852  
 (87) 国際公開番号 WO95/16911  
 (87) 国際公開日 平成7年(1995)6月22日  
 (31) 優先権主張番号 08/170, 078  
 (32) 優先日 1993年12月17日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71) 出願人 パーキン・エルマー コーポレーション  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 94404 フォスター シティ, リンカーン  
 センター ドライブ 850 アブライド  
 バイオシステムズ ディビジョン  
 (72) 発明者 マダプシ, ラマクリシュナ, エス  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
 94404 フォスター シティ, カタマラン  
 ストリート 609, アパートメント  
 #1  
 (74) 代理人 弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キャピラリー電気泳動による生体分子の分離のためのポリマー

## (57) 【要約】

本発明はキャピラリー電気泳動における電気浸透流を抑制し分析物-壁の相互作用を減らすための荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーを提供する。本発明の一面では、1またはそれ以上のこの種のポリマーは生体分子、例えばポリヌクレオチド類、多糖類、蛋白質類等をキャピラリー電気泳動によって分離するための分離媒質の成分として用いられる。一般にこの種のポリマーは、(i) 約20℃ないし約50℃の温度範囲にわたる水溶解性、(ii) 約0.001%ないし約10% (重量/容量) の範囲の分離媒質における濃度、(iii) 約 $5 \times 10^5$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv) 約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在によって特徴づけられる。一具体例では、本発明のポリマーはポリラクタム類、例えばポリビニルピロリドン; N, N-二置換ポリアクリルアミド類; およびN-置換ポリアクリルアミド類からなる群から選ばれる。本発明の方法によれば、十分な分量のポリマーはキャピラリー表面に吸着し高い粘度帯を確立し、壁から分析物を遮蔽し電場下の電気二重層の移動を妨げる。

## 【特許請求の範囲】

1. (i)約20℃ないし約50℃の温度範囲の水溶解性、(ii)約0.001%ないし約10%（重量／容量）の範囲の分離媒質における濃度、(iii)約 $5 \times 10^3$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv)約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在を特徴とする1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーを含有する分離媒質を提供することからなる、キャピラリー電気泳動において電気浸透流を抑制する方法。

2. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーが実質的にヒドロキシル基がない請求項1記載の方法。

3. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリラクタムである請求項2記載の方法。

4. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリビニルピロリドンである請求項3記載の方法。

5. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がN, N-二置換ポリアクリルアミドまたはN-置換ポリアクリルアミドであり、前記窒素置換基がC<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；ハロ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；メトキシ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；およびヒドロキシル置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキルからなる群から選ばれる請求項1記載の方法。

6. 前記窒素置換基がC<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；ハロ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；およびメトキシ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキルからなる群から選ばれる請求項5記載の方法。

7. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリ（ジメチルアクリルアミド）である請求項6記載の方法。

8. 前記電気浸透流が約 $2 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/秒-ボルトよりも小さい請求項7記載の方法。

9. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーが理論プレートの数と、約100ないし約500のヌクレオチドの大きさの範囲のポリヌクレオチドの大きさとの間で実質的に直線関係を与える請求項7記載の方法。

10. (i)約20℃ないし約50℃の温度範囲の水溶解性、(ii)約0.001%ないし約

10% (重量/容量) の範囲の分離媒質における濃度、(iii)約 $5 \times 10^3$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv)約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在を特徴とする1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーを含有する分離媒質を提供することからなる、キャピラリー電気泳動において壁-分析物の相互作用を抑制する方法。

11. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーが実質的にヒドロキシル基がない請求項10記載の方法。

12. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリラクタムである請求項11記載の方法。

13. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリビニルピロリドンである請求項12記載の方法。

14. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がN, N-二置換ポリアクリルアミドまたはN-置換ポリアクリルアミドであり、前記窒素置換基が $C_1$ ないし $C_3$ アルキル; ハロ置換 $C_1$ ないし $C_3$ アルキル; メトキシ置換 $C_1$ ないし $C_3$ アルキル; およびヒドロキシル置換 $C_1$ ないし $C_2$ アルキルからなる群から選ばれる請求項10記載の方法。

15. 前記窒素置換基が $C_1$ ないし $C_3$ アルキル; ハロ置換 $C_1$ ないし $C_3$ アルキル; およびメトキシ置換 $C_1$ ないし $C_3$ アルキルからなる群から選ばれる請求項14記載の方法。

16. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの少なくとも1がポリ(ジメチルアクリルアミド)である請求項15記載の方法。

17. 前記電気浸透流が約 $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{秒}$ -ボルトよりも小さい請求項16記載の方法。

18. 前記1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーが理論プレートの数と、約100ないし約500のヌクレオチドの大きさの範囲のポリヌクレオチドの大きさとの間で実質的に直線関係を与える請求項16記載の方法。

19. 電荷運搬成分;

篩分け成分; および

(i)約20℃ないし約50℃の温度範囲の水溶解性、(ii)約0.001%ないし約

10% (重量/容量) の範囲の分離媒質における濃度、(iii)約 $5 \times 10^3$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv)約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在を特徴とする1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーからなる表面相互作用成分からなる、キャピラリー電気泳動によってポリヌクレオチドを分離するための組成物。

20. 約5000センチポアズよりも小さい粘度を有する請求項19記載の組成物。

21. コーティングしていないシリカキャピラリーにおいて電気泳動によって異なる大きさのポリヌクレオチドを分離する方法が：

第一端部と第二端部を有するコーティングしていないシリカキャピラリーを用意し、このコーティングしていないシリカキャピラリーが(i)約20℃ないし約50℃の温度範囲の水溶解性、(ii)約0.001%ないし約10% (重量/容量) の範囲の分離媒質における濃度、(iii)約 $5 \times 10^3$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv)約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在を特徴とする1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーを含み；

コーティングしていないシリカキャピラリー中に異なる大きさのポリヌクレオチドの試料を装填し；そして

コーティングしていないシリカキャピラリーを通して試料中の異なる大きさのポリヌクレオチドが移動するように、コーティングしていないシリカキャピラリーの第一と第二の端部間に電場を印加する、各工程からなる方法。

## 【発明の詳細な説明】

キャピラリー電気泳動による  
生体分子の分離のためのポリマー  
関連する米国出願

これは現在係属中の、1993年12月17日に出願した出願番号08/170,078の一部継続出願であり、ここに参考文献として加える。

発明の技術分野

本発明は一般にキャピラリー電気泳動の分野に関し、さらに特にキャピラリー電気泳動によって、生体分子、特にポリヌクレオチドの分離中に電気浸透流および分析物-壁の相互作用を抑制するための物質および方法に関するものである。

背景

キャピラリー電気泳動は幾つかの技術的利点があるので分析技術として広く応用されてきた：(i)キャピラリーは、一層有効な熱散逸を可能にし、また、一層迅速に分離するために使用されるように高い電場を可能にする、高い表面对容量比を有し；(ii)その技術は最少の試料容量を必要とし；(iii)大抵の分析物の優れた分解能を達成でき；そして(iv)この技術は自動化しやすい、例えばCamiiller i, 編集者, Capillary Electrophoresis: Theory and Practice (CRC Press, Boca Raton, 1993)；およびGrossman et al, 編集者, Capillary Electrophoresis (Academic Press, San Diego, 1992)。これらの利点のため、特に核酸分析において、キャピラリー電気泳動を生体分子の分離に応用することに大きい関心があった。核酸、特にデオキシリボ核酸(DNA)を迅速に正確に分離するための要求は、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)生成物の分析およびDNA配列分析断片の分析で生じた、例えば、Williams, Methods 4: 227-232(1992)；Drossman et al, Anal. Chem., 62: 900-903(1990)；Huang et al, Anal. Chem., 64: 2149-2154(1992)；およびSwerdlow et al, Nucleic Acids Research, 18: 1415-1419(1990)。

電荷対摩擦牽引比がフリー溶液中の異なる大きさのポリヌクレオチドでは同じであるから、電気泳動分離には篩分け媒質が存在することが必要である。初期に

選択する篩分け媒質はゲルであったが、安定性や製造可能性の問題で非ゲル液体重合篩分け媒質、例えば線形ポリアクリルアミド、ヒドロキシアルキルセルロース、アガロース、および酢酸セルロース等を検査しなければならなかった、例えば、Bode, Anal. Biochem., 83: 204-210(1977); Bode, Anal. Biochem., 83: 364-371(1977); Bode, Anal. Biochem., 92: 99-110(1979); Hjerten et al, J. Liquid Chromatography, 12: 2471-2477(1989); Grossman, 米国特許5,126,021; Zhu et al, 米国特許5,089,111; Tietz et al, Electrophoresis, 13: 614-616(1992)。

キャピラリー電気泳動による分離を面倒にする他の因子は電気浸透 (electroosmosis) の現象である。この現象は、電気浸透 (electroosmosis) とよばれることもあり、電場により引き起こされるキャピラリー中の流体流である。DNA配列の断片の分析のような、高い分解能の分離を必要とする状態でキャピラリー電気泳動を応用することを妨げていた。この現象はキャピラリー電気泳動においてキャピラリーの内壁がカウンターイオンの移動層を形成させる固定化された電荷を含むとき、また、大半の液体流を生じるように電場の存在で移動するとき生じた。不幸にも、電気浸透流の大きさは、電荷の分布における変化、分析物および／または分離媒質の成分の選択的吸着、分離媒質のpH等を含む多数の因子に依存して変化することができる。この変化は間隔が密なバンドの分析物の分解能を減らす傾向にあるため、直接的または間接的にこの種の流れをコントロールするように多くの試みがなされた。これらの試みには、荷電基を抑制するようにキャピラリーの内壁を電子対共有に変更すること、高粘度のポリマーの使用、緩衝液のpHおよび／または濃度の調整、キャピラリー内壁に共有結合したゲル分離媒質の使用、および電場放射部のキャピラリー軸への適用が含まれる、例えばHayes et al, Anal. Chem., 65: 2010-2013(1993); Grossman et al (上記); Hjerten, 米国特許4,680,201; Van Alstine et al, 米国特許4,690,749; Wiktorowicz et al, Electrophoresis, 11: 769-773(1990); Belder et al, J. High Resolution Chromatography, 15: 686-693(1992)。

これらのアプローチの多くは種々うまく行き、あるいは化学的には核酸とは全く異なる分析物の分離にのみ使用されていた。特に、DNA分離のためにキャピ

ラリーゲルを使用することは製造の問題および使用中の安定性や信頼性の問題が障害になっていた、例えばSwordlow et al, Electrophoresis, 13: 475-483(1992)。

種々の生体分子、特にポリヌクレオチドを手軽に正確に分離できることに科学的産業的に大きい関心があることから、電気浸透流を抑制し分析物-壁の相互作用を減らすことができる低粘度の電気泳動分離媒質を入手することが望まれている。

### 発明の概要

本発明はキャピラリー電気泳動において電気浸透流を抑制し分析物-壁の相互作用を減らすための荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーの使用に関する。本発明の一局面では、1またはそれ以上のこの種のポリマーが生体分子、好ましくはポリヌクレオチド類をキャピラリー電気泳動によって分離するための分離媒質の成分として用いられる。一般に、この種のポリマーは、(i)約20℃ないし約50℃の温度範囲にわたる水溶解性、(ii)約0.001%ないし約10%（重量/容量）の範囲の分離媒質における濃度、(iii)約 $5 \times 10^3$ ないし約 $1 \times 10^6$ ダルトンの範囲の分子量、および(iv)約6ないし約9の範囲のpHを有する水性媒質中の荷電基の不在を特徴とする。好ましくは、この種の本発明のポリマーは実質的にヒドロキシル基がない。一具体例では、本発明のポリマーはポリビニルラクタム、例えばポリビニルピロリドン；N，N-二置換ポリアクリルアミド類；およびN-置換ポリアクリルアミド類からなる群から選ばれる。さらに好ましくは、本発明のこの種のポリマーはポリ（N，N-ジメチルアクリルアミド）である。

本発明の方法によれば、十分な分量のポリマーはシリカ表面に吸着し、電場下の電気二重層の移動を妨げ壁から分析物を遮蔽するシリカ表面を高粘度帯にする。

本発明は、キャピラリー電気泳動によって、生体分子、特にポリヌクレオチドを分離するため本発明のポリマーを使用する方法、キャピラリー中の生体分子を電気泳動により分離するための本発明のポリマーからなる組成物；およびDNAの配列分析のため本発明の分離媒質を使用する方法を含む。

本発明は、キャピラリー表面に本発明の荷電していないポリマーを吸着させる



ことによる壁-分析物の相互作用および電気浸透流を動的に抑制して、キャピラリー中の電気泳動による生体分子の分離の精度を高める。抑制は分離工程を通じて本発明のポリマーが、分離媒質中の溶液中のポリマーと平衡にキャピラリーの表面に吸着しそこから脱着するという意味で動的である。従って、抑制の一定度は分離行程中だけでなく、分離行程から分離行程までも維持される。

#### 図面の簡単な説明

図1はキャピラリー電気泳動を行うための装置の概略図である。

図2はグリシルグリシン緩衝液中の3%ポリ（ジメチルアクリルアミド）溶液（RM8）で分離された100塩基対DNAラダーの電気泳動図である。

図3はグリシルグリシン緩衝液中の3%ポリ（ジメチルアクリルアミド）溶液（RM18）で分離された100塩基対DNAラダーの電気泳動図である。

図4はTBE緩衝液中の3%ポリ（ジメチルアクリルアミド）溶液（RM18）で分離された100塩基対DNAラダーの電気泳動図である。

図5はグリシルグリシン緩衝液中の3%ポリアクリルアミドと0.05%ポリ（ジメチルアクリルアミド）（RM18）からなる2成分ポリマー溶液中で分離された100塩基対DNAラダーの電気泳動図である。

図6Aないし6Fは種々の2成分ポリマー溶液で分離された100塩基対DNAラダーの電気泳動図である。

図7Aないし7Jはポリ（ジメチルアクリルアミド）の6.5%溶液を含む分離媒質中で分離された市販品として入手できるDNA配列分析断片標準品の電気泳動図である。

図8はポリ（ジメチルアクリルアミド）の6.5%溶液を含む分離媒質中での4色配列分析標準品の分離と配列分析を示す電気泳動図である。ピーク上の数字は配列中の塩基数を示し、各ピーク上の文字は塩基の同一性を示す。

#### 定義

ここで使用される“キャピラリー”の語は電気泳動を行うため分離媒質の容量を支持することができるチューブまたはチャネルまたは他の構造を意味する。キャピラリーの外形は広く変えることができ、円形、矩形または正方形の断面をも

つチューブ、チャネル、溝、プレート等を含み、広範囲の科学技術によって製造することができる。本発明に使用するキャピラリーの重要な特徴は分離媒質の容

量と接触する表面の表面对容量比である。この比の高い値は電気泳動中に分離媒質からの熱伝達を良くすることができる。好ましくは、約0.4ないし.04の範囲の値が用いられる。これらは内径が約 $10\mu\text{m}$ ないし約 $100\mu\text{m}$ の範囲の円形断面をもつ環状キャピラリーの表面对容量比に相当する。好ましくは、本発明で使用するキャピラリーはシリカ、溶融シリカ、石英、シリケートをベースとしたガラス、例えばボロシリケートガラス、ホスフェートガラス、アルミナ含有ガラス等、または他のシリカ様物質から作られる。

“生体分子”の語は水溶性で約6ないし9のpH範囲で荷電される生物学上の有機物によって一般的に合成される分子を意味する。好ましくは、この生体分子の語は蛋白質類、糖蛋白質類、天然および合成ペプチド類、アルカロイド類、多糖類、ポリヌクレオチド類等を含む。さらに特に、生体分子の語はポリヌクレオチドを示す。

ここで用いられる“ポリヌクレオチド”の語は、二本および一本鎖のデオキシリボヌクレオシド類、リボヌクレオシド類、それらの $\alpha$ -アノメリック形態等を含む、天然または改変したヌクレオシド単量体を示す。通常ヌクレオシド単量体はホスホジエステル結合またはその類似体によって結合されて、数単量体単位、例えば8~40から、数千の単量体単位までの大きさの範囲のポリヌクレオチドを形成する。ポリヌクレオチドが“ATGCC TG”のような配列文字によって示されるときは常に、ヌクレオチドは左から右へ5'→3'の順であり、他に示されなければ“A”はデオキシアデノシン、“C”はデオキシシチジン、“G”はデオキシグアノシン、そして“T”はチミジンを示すことであると解される。ホスホジエステル結合の類似体はホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホルアニリデート、ホスホルアミデート等を含む。

ここで使用されるように、“ヌクレオシド”は、2'-デオキシおよび2'-ヒドロキシ形態を含む天然のヌクレオシドを含み、例えばKornberg and Baker, DNA

Replication, 2nd Ed. (Freeman, San Francisco, 1992)に記載がある。ヌクレオシドに関して“類似体”は改変された塩基部分および／または改変された糖部分を有する合成ヌクレオシドを含み、例えば一般に Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, New York, 1980)によって記載されている。

ここで使用される“電気浸透”または“電気浸透流”の語は、キャピラリー壁のような、表面の固定または不動の電荷に近接した移動カウンターイオンの層の電界の影響による液体のバルク流を示す。電気浸透流は一般的に、例えば緩衝液の濃度および種類、チューブの長さ、電界強度等を決定する一組の標準状態下にキャピラリーチューブを通るテスト分析物の移動度( $\text{cm}^2/\text{sec-volts}$ )として測定される。

“ポリマー”の語は特徴ある方法で共に共役結合したさらに小さい単量体サブユニットからなる大きい分子である。“ホモポリマー”は1種類のための単量体サブユニットから作られたポリマーである。“コポリマー”は2種類またはそれ以上の単量体サブユニットから作られたポリマーを示す。ここで使用されるように“ポリマー”の語はホモポリマーおよびコポリマーを含む。“単分散”ポリマー溶液は溶液中のポリマー分子が実質的に同じ分子量を有することを意味する。“多分散”ポリマー溶液は溶液中のポリマー分子が分散した分子量を有することを意味する。

ポリマーに関してここで使用される“ヒドロキシル基がない”の語はポリマーの合成に使用される単量体がヒドロキシル置換基を含まないことを意味する。

#### 発明の詳細な説明

本発明は生体分子、特にDNAを、キャピラリー電気泳動によって分離する間に電気浸透流および壁-分析物の相互作用を抑制するための手軽な手段を提供する。ここで使用されるように、“分離媒質”の語は分析物成分の分離が行われるキャピラリー中の媒質を示す。分離媒質は一般的に複数の成分からなり、その少なくともひとつは電荷運搬成分、即ち電解質である。電荷運搬成分は通常一定のpHで分離媒体を維持するための緩衝液系の一部である。ポリヌクレオチド、または異なる大きさであるがフリー溶液中で同じ電荷-摩擦抵抗比を有する他の生

体分子を分離するための媒質は、さらに篩分け成分を含む。この種の従来の成分に加えて、本発明の分離媒質は表面相互作用成分からなる。ポリヌクレオチド分離の場合には、この篩分け成分は表面相互作用成分と同じかまたは異なってもよいが、通常は異なる。表面相互作用成分は上記の物理的性質を有する1またはそ

れ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーからなる。好ましくは、この種の1またはそれ以上の荷電していない水溶性シリカ吸着ポリマーはヒドロキシル基がない。ポリヌクレオチド分離についてさらに言及すると、本発明の分離媒質の篩分け成分は1またはそれ以上の架橋されていない、特に線状の、ポリマーからなる。好ましくは、本発明の分離媒質の成分はその粘度が分離行程間にキャピラリーを迅速に再充填できるように十分に低くなるように選ばれる。典型的なキャピラリーは、例えば内径が20~100 $\mu$ mで長さが40~60cmで、篩分け成分が存在せず、粘度が好ましくは1000センチポアズ以下であり、さらに好ましくは約1~300センチポアズである。篩分け成分が存在すると、粘度は好ましくは5000センチポアズ以下であり、さらに好ましくは、1000センチポアズ以下である。

分離媒質の表面相互作用成分として使用するポリマーは、次の参考文献に記載されているような、種々の化学分類に属することができる、Molyneux, Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behavior, Volumes I and II(CRC Press, Boca Raton, 1982); Davidson, Editor, Handbook of Water-Soluble Gums and Resins(McGraw-Hill, New York, 1980); Franks, editor, Water: A Comprehensive Treatise(Plenum Press, New York, 1973)等。好ましくは、本発明の荷電されていない水溶性シリカ吸着ポリマーは、制限されないが、N, N-二置換ポリアクリルアミド類、N-モノ置換ポリアクリルアミド類、ポリメタクリルアミド、ポリビニルピロリドン等を含む。ポリアクリルアミド類の例示的置換基はC<sub>1</sub>ないしC<sub>12</sub>アルキル; ハロ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>12</sub>アルキル; メトキシ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>12</sub>アルキル; ヒドロキシル置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>12</sub>アルキル等を含む。好ましくは、ハロ置換基はフルオロであり、そしてヒドロキシル置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>12</sub>アルキルはモノ置換されている。上記単量体置換基は得られるポリマーが水溶性であるように選択されることと理解される。例えば、C<sub>12</sub>アルキル含有単量体

はコポリマーの小さい分別成分として存在出来るのみであることは明らかである。さらに好ましくは、例示的な置換基はC<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；ハロ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；メトキシ置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキル；およびヒドロキシル置換C<sub>1</sub>ないしC<sub>3</sub>アルキルからなる群から選ばれる。

この種のポリマーは、例えばOdiان, Principles of Polymerization, Third Edition(John Wiley, New York, 1991)に記載されているような従来技術によって合成される。本発明の重要な特徴は表面相互作用成分のポリマーが荷電されていないことである。好ましくは、本発明のポリマーは、荷電されていない開始剤を使用できるような無水条件下に合成される。この種の条件はまた、荷電した開始剤が生成物に混入することを防ぐ。分離媒質の表面相互作用成分からなるポリマーは約.001%ないし約10% (w:v)の濃度で存在することができる。好ましくは、この種のポリマーは約.01%ないし約6%の範囲の濃度で存在する。

好ましいポリマーのシリカ吸着の品質は多くの良く知られた方法、例えば偏光解析法、吸着テスト粒子の流体力学的性質の変化の測定、吸着等温線の測定または類似の方法によって測定することができる。この種の技術はMalmsten et al, *Macromolecules*, 25: 2474-2481(1992); Rob and Smith, *European Polymer J.*, 10: 1005-1010(1974); Vincent et al *Surf. Colloid Sci.*, 12: 1-117(1982); Takahashi et al, *Advances in Polymers Science*, 46: 1-65(1982)等に記載されている。吸着等温線は一定の温度で所定の物質の溶液の吸着剤によって及ぼされる吸着をグラフで示す。吸着等温線の測定は、その吸着を測定することになっている物質（被吸着体）の既知濃度の溶液を調製する必要がある。この被吸着体の溶液はこの被吸着剤が表面に付着する既知の分量の物質（吸着剤）と混合する。溶液中の被吸着剤と吸着剤の表面の被吸着剤との間が一旦平衡になると、被吸着剤溶液の濃度が測定される。溶液の濃度の減少は標準状態での被吸着剤の吸着の度合を測定する。

吸着の度合はまた次のパラメーター：緩衝液のタイプおよび濃度、温度、電界強度、キャピラリーのタイプ、直径、および長さ、およびテスト分析物の一組の標準値の下に電気泳動流の減少を観察して直接測定することもできる。この種の

測定のための例示的な標準法は次の通りである：全長40cmのコーティングされて  
いない溶融シリカキャピラリー、検出器（UV）まで20cm、内径75 $\mu$ m、0.1Mの  
グリシルグリシン緩衝液（pH8.0）；0.92mMのメシチルオキシドと1 mMの p-  
トルエンスルホン酸（p-TSA）のマーカ溶液；10kV下に30℃での電気泳動  
。テストされるポリマーを緩衝液に添加する。表面相互作用成分がないと、電気  
浸透流は約  $6 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/秒-ボルトである。好ましくは、この種の分離媒質では  
、

十分な濃度の本発明のポリマーを用いて約  $2 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/秒-ボルトまで電気浸透  
流を減らす。

ポリヌクレオチド分離については、本発明のポリマーのシリカ吸着の品質は好  
ましくは一組の標準条件の下に選ばれたポリヌクレオチド“ラダー”に対する分  
解能とポリヌクレオチドの長さとの間の関係を特徴とする。分解能は都合のよい  
ことには、テスト装置の理論プレート数、Nで表される。 $N = (L/\sigma)^2$ （  
式中、Lは注入口から検出器までのピーク下（通常ピーク最大値の位置）のテス  
ト分析物の平均路長であり、 $\sigma$ はピークの分散である。好ましくは、本発明のポ  
リマーは理論プレート数と、約100ないし約500のヌクレオチドの範囲にわたる  
ポリヌクレオチドの大きさとの間で実質的に直線関係を与える；さらに好ましく  
は、その関係は約20ないし約600のヌクレオチドの範囲にわたって直線である。  
ポリヌクレオチド長の曲線に対する理論的プレートを生じるための条件の標準組  
を以下に記載する。

上述の大きさの範囲において異なる大きさのポリヌクレオチドの例示的ラダー  
は市販されているキット、例えば、BRL-GIBCOから販売されている100塩基対二本  
鎖DNAラダー、アプライド・ハイオシステムズ社から販売されているTaqDNA  
Sequencing Standard等が入手可能である。標準分離媒質は次のようにして調  
製することができる：0.60 gのアクリルアミド（きわめて純粋、ICN, Costa Mesa  
, CA）を10ml 1 $\times$ TBE, 30%ホルムアミド、3.5Mの尿素緩衝液に溶解し、濾過し（  
0.2 $\mu$ mの孔径）、そして脱気する。単量体溶液は、1 $\mu$ lの100% N, N, N', N  
'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）および2 $\mu$ mの過硫酸アンモニウムを

、単量体溶液 1 mlにつき (0.02% w:vのAPSおよび0.1% v:vのTEMEDの最終濃度を与えるように) 水に溶解した10% w:v(APS)、を添加して室温で重合する。

上記分離媒質は55cmのコーティングしていない溶融シリカキャピラリーチューブ、50 $\mu$ mの内径、検出器まで40cm、に装填される。キャピラリーは蛍光検出キャピラリーを有する市販品のキャピラリー電気泳動装置中で使用できる。キャピラリー中で蛍光標識の分析物を検出するための蛍光検出装置は当該分野では良く知られている、例えばMathies et al, 米国特許5,091,652; Mathies et al,

国際出願番号PCT/US93/01607; Ruiz-Martinez et al, Anal. Chem. 65: 2851-2858(1993)等。標準物からのDNA断片は次のように変性され動電学的に装填される: 乾燥した試料は5 mMのEDTA水溶液(0.5 $\mu$ l)およびホルムアミド(6 $\mu$ l)の混合物に再懸濁させる。懸濁液を90℃で2分間加熱し次いで氷浴に移す。ラダーはキャピラリーの陰極と陰極端を上記溶液に入れ次いで5秒間チューブに6 kVを印加して装填される。ラダー中のDNA断片の分離はキャピラリーの陰極と陰極端を陰極貯蔵器に戻して12kVのランニングボルトを印加して開始する。

キャピラリー電気泳動を行うための装置は既知であり本発明の重要な特徴ではない。基本装置を記載する多くの参考文献が入手可能であり、幾つかのキャピラリー電気泳動装置が市販されている、例えばアプライド・ハイオシステムズ(Foster City, CA)モデル270A機器がある。キャピラリー電気泳動装置とそれらの操作を記載する具体的な参考文献はJorgenson, Methods, 4: 179-190(1992); Colburn et al, Applied Biosystems Research News, issue 1 (1990冬); Grossman et al(上記)等を含む。図1は本発明を実施するために適した例示的なキャピラリー電気泳動装置20を示す概略図である。しかしながら、上述のように、図に示されるものの他に本発明で使用するために広範囲の装置が吟味できる、例えばHarrison et al, Science, 261: 895-897(1993); Pace, 米国特許4,908,112; Kambar et al, 米国特許5,192,412; Seiler et al, Anal. Chem., 65: 1481-1488 (1993)等に記載されている。図において、キャピラリーチューブ22は好ましくは長さが約10ないし200cmの間にあり、典型的には約100cm以下であり、好ましい直径は約10ないし200 $\mu$ mの範囲にあり、さらに典型的には約50ないし75 $\mu$ mの範囲に

あり、例えばPolymicro Technologies (Phoenix, AZ) から入手できる。好ましくは、チューブの内面にはコーティングがない。装置20の陰極貯蔵器26は、さらに下記のように、分離媒質28を含む。キャピラリーチューブ22の陰極端22aは貯蔵器26内に密閉されて電気泳動中に分離媒質中に浸漬される。貯蔵器26中の第二のチューブ30は、例えば正圧によってキャピラリーチューブに分離媒質を装填するため、分離媒質上の頭部空間で圧力を制御するために使用できる細かく制御された空気圧装置に連結される。試料貯蔵器31はキャピラリー22の陰極端に装填されるための試料混合物を含む。キャピラリー22の陽極端22bは陽極

貯蔵器34に含まれる分離媒質32に浸漬される。貯蔵器34中の第二のチューブ36は分離媒質32上の圧を制御するために含ませることができる。高ボルト供給器40は陰極および陽極貯蔵器に電極41および42によって連結される。高ボルト供給器40は数千ボルト (kV) ないし60kV、典型的には約10ないし30kVの電位の範囲で電極を横切って一定の電位を生じる。キャピラリーを通る電流は一般にマイクロアンペア、典型的には数 $\mu$ Aないし100 $\mu$ A、典型的には20 $\mu$ Aの範囲である。キャピラリー22に接近した位置の検出器44はキャピラリーの光学検出帯45を通して移動する試料ピークを監視する。典型的には、光学検出帯45は、通常のポリイミドコーティングがUVおよび/または可視光、例えば蛍光、分離した分析物の検出を可能にするように移動したキャピラリー22の領域からなる。UV吸収、蛍光発光、コンダクタンス、放射性発光等を含めて、広範囲の検出計画が本発明とともに用いるために吟味できる。例えば、蛍光分析物のための検出システムはZare et al, 米国特許4,675,300およびFolestad et al, 米国特許4,548,498に記載されている。

上述のように、本発明の分離媒質は一般に3成分からなる：電荷運搬成分、篩分け成分、および表面相互作用成分である。ポリヌクレオチド中の二重または第二の構造の形成を避けることが望ましい場合には変性剤のような、追加の成分もまた特定例において含めることができる。好ましい変性剤にはホルムアミド、例えば40～90%、尿素、例えば6～8 M、ピロリドンのような、市販品のラクタム等を含む。電気泳動にそれらを使用するためのガイダンスは既知の分子生物学の



参考文献、例えばSambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989)に見出すことができる。

典型的には、pHを制御するための緩衝液システムは電荷運搬成分として用いられる。例示的な緩衝液は有機酸、例えばクエン酸、酢酸、または蟻酸；両性イオン、例えばTES（N-トリス〔ヒドロキシメチル〕-2-アミノエタンスルホン酸、BICINE（N, N-ビス〔2-ヒドロキシエチル〕グリシン、ACES（2-〔2-アミノ-2-オキシエチル〕-アミノ〕エタンスルホン酸）またはグリシルグリシン；無機酸、例えば磷酸；および有機塩基、例えばシグマ社

から入手できるトリス（トリス〔ヒドロキシメチル〕アミノメタン）緩衝液の水溶液を含む。緩衝液の濃度は広く変えられ、例えば約1 mMないし1Mの間であるが、典型的には約20mMである。従来のキャピラリー電気泳動用の例示的な緩衝液溶液には次のものを含む：(i)一本鎖ポリヌクレオチドの分離に対して0.1Mトリス、0.25M硼酸、7M尿素および7.6のpH；または(ii)二本鎖ポリヌクレオチド分離に対して0.089Mトリス、0.089M硼酸、0.005M EDTA。非両性イオン緩衝液システムに対しては、好ましくはPDMAまたはポリビニルピロリドンが表面相互作用成分として用いられる。

電気泳動分離媒質の篩分け成分は当該分野で良く知られており、Zhu et al, 米国特許5,089,111; Ruiz-Martinez et al, Anal. Chem., 65: 2851-2858(1993); Williams, Methods, 4: 227-232(1992);および同様の参考文献に開示されている。好ましくは、本発明の分離媒質の篩分け成分はグROSSマンの米国特許5,126,021によって教示されるような低粘度のからみ合ったポリマー溶液である。例えば大規模のDNA配列分析に応用するために、キャピラリーを自動化システムで再充填することができるように低粘度の分離媒質が好ましい。キャピラリーを通る溶液流の速度は逐次分析の間に分離媒質を取り替えるためにどのくらいの時間が必要であるかを決定する。DNA篩分けの応用に適する粘度範囲のからみ合ったポリマーを合成するためのガイダンスはグROSSマンによって提供され、これを参考文献として加える。一般に、ポリマー、またはコポリマー、溶液の粘度は

分離媒質のポリマーまたはコポリマー成分の分子量 (MW) および濃度によって決定される。ポリマーまたはコポリマーの分子量は当該分野で良く知られている多くの方法で合成中に調整することができる、例えば Odian, Principles of Polymerization, Third Edition (John Wiley, New York, 1991)、または同様の参考文献に概説がある。

本発明で使用されるポリマーまたはコポリマーの平均MWを制御するための第二のアプローチは多分散のポリマー生成物を異なるMW画分に分別し精製することである。典型的な分別技術はゲル透過クロマトグラフィー、特定のMW切断部をもつ膜を使用する透析、メタノールのような水混和性溶媒中の分別沈澱等を含む。

従来のキャピラリーチューブを用いる装置について、ポリマーまたはコポリマーMWの上限および/または濃度はチューブに押し出すまたは引き出すことができる上部の粘度によって最初書き取られる。例えば、大きい内径 (IDs) (例えば約0.01cmの半径) の短いキャピラリー (約20cmの長さ) を用いる場合には、38,000センチポアズだけの粘度の溶液を30分で高圧、例えば100psiにてキャピラリーに押し出すことができる。さらに従来のキャピラリーチューブ、例えば50 $\mu$ m IDおよび50cm長では、約10~1000の範囲の粘度で約50~100psiのチューブ内の圧差を用いて約30分以内で分離媒質が取り替えられる。

例示的な篩分けポリマーは線状ポリオキシド類；ポリエチレンオキシドおよびポリプロピレンオキシドのようなポリエーテル類；ポリアクリルアミド；ポリメタクリルアミド；ポリビニルピロリドン；ポリビニルオキサゾリドン；および種々の水溶性ヒドロキシルポリマー、例えばデキストランのような水溶性天然ガム；メチルセルロースおよびヒドロキシエチルセルロースのような水溶性セルロース成分、およびコポリマーおよびこれらポリマーのブレンドを含む。好ましくは、このようなポリマーは約.5%と10%w:vの範囲の濃度で使用される。

二本鎖ポリヌクレオチド、例えばPCRまたはLCR増幅物からのDNA断片、酵素消化物等は標準プロトコル、または市販のキャピラリー電気泳動器具、例えばモデル270-HT器具 (Applied Biosystems, Inc., Foster City) が用いられて

いる製造業者が提案したプロトコルによって分離される。このような標準プロトコルまたは提案されたプロトコルの唯一の例外は本発明の分離媒質を用いることである。

本発明によるDNA配列分析はDNA配列分析プロトコルによって調製される一本鎖ポリヌクレオチドの分離を必要とし、例えばSambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989); Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Media, PA) 等に記載されている。

現在入手できるDNA配列分析プロトコルの重要な特徴は、大きさによって分離しなければならない一本鎖ポリヌクレオチドの“ネストシリーズ”または“ラダー”、またはDNA配列分析断片の生成である。DNA配列分析への鎖終端の

アプローチの基本ステップは(1)サブシーケンスとして、配列を決定すべき標的核酸を含む鋳型核酸およびオリゴヌクレオチドプライマーを用意し、(2)オリゴヌクレオチドプライマーを鋳型核酸にハイブリッド形成し、(3)プライマーを核酸ポリメラーゼ、例えばT7 DNAポリメラーゼ、Sequenase(登録商標)、リバーストランスクリプターゼ等を用いて、ヌクレオシドトリホスフェート前駆体および少なくとも一つの鎖終止ヌクレオチドを含む反応混合物中で伸長して、DNA断片集団のネストシリーズを形成し、一層短い各DNA断片が一層長い各DNA断片のサブシーケンスであるようにし、そして同じ大きさの各DNA断片が同じ鎖終止ヌクレオチドで終結するようにし、(4)大きさによってDNA断片集団を分離し、そして(5)各DNA断片集団と結合した鎖終止ヌクレオチドを同定することである。ここで使用される“ヌクレオシドトリホスフェート前駆体”の語は、デオキシアデノシントリホスフェート(ATP)、デオキシシチジントリホスフェート(CTP)、デオキシグアノシントリホスフェート(GTP)、およびチミジントリホスフェート(TTP)、またはそれらの類似体、例えばデオキシイノシントリホスフェート(ITP)、7-デアザデオキシグアノシントリホスフェート等を示す。

鋳型はこの分野の教示により準備される、例えば Technical Manual for Mode

1370ADNAシーケンサー(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)。例えば、標的シーケンスはM13クローニングベクターの複製形態のような適当なクローニングベクターに挿入でき、次に標的シーケンスのコピーの数を増幅するように増殖される。M13の一本鎖形態は鋳型として使用するため単離される。あるいは、鋳型はこの分野で教示されているようなポリメラーゼ鎖反応(PCR)によって提供できる、例えばInnis et al (上記); Wilson et al, Biotechniques, Vol.8, 184-189頁(1990); Gyllensten, Biotechniques, Vol.7, 700-708頁(1989)等。増幅後、鋳型は液相中でまたは固相支持体に結合させて重合反応で使用でき、例えばStahl et al, Nucleic Acids Research, Vol.16, 3025-3038頁(1988)Hultman et al, Nucleic Acids Research, Vol.17, 4937-4946(1989)等に教示されている。

一旦ネストシリーズDNA断片が生成すると、本発明の分離媒質を用いるキャピラリー電気泳動によって分離される。

#### 実施例1

##### AIBNを使用するジオキサン中のPDMAの合成

ポリ(N, N-ジメチルアクリルアミド)(PDMA)は、例えばTrossarelli et al, J. Polymer Sci., 57: 445-452 (1962)に開示されているように、従来技術を用いて合成される。既知量のジメチルアクリルアミド(DMA)、ジオキサン、およびアゾビスイソブチロニトリル(AIBN)をエルレンマイヤーフラスコ中で混合し、アルゴンガスを室温で10分間溶液に通して泡立たせた。重合は温度を55℃まであげて開始した。重合時間は単量体の濃度に依存して10ないし25分の範囲であった。重合後、得られたポリマーを3サイクルのヘキサンによる沈澱とCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>中の溶解によって精製した。最後に、ヘキサン沈澱物を夜通し真空デシケーターで乾燥させて次に凍結乾燥させた。下表に種々の実験の反応条件をまとめる。

バッチ番号	単量体濃度 (%W/V)	ジオキサン(cc)	A I B N (mg)	概算平均 分子量*
R M 1	70	14.3	12	79kd
R M 2	60	17.0	14	92kd
R M 3	50	20.0	16	99kd
R M 4	40	25.0	21	97kd
R M 5	30	33.3	27	83kd
R M 6	20	50.0	41	--
R M 7	10	100.0	82	69kd
R M 8	5	200.0	164	54kd

\*ゲル浸透クロマトグラフィーによる概算値 (peak mol. wt.).

## 実施例 2

### A I B N を使用する t-ブチルアルコール中の PDMA の合成

次のプロトコルを用いて t-ブチルアルコール (t-BuOH) でさらに重合を行った: 既知量の DMA 単量体、t-ブチルアルコール、および A I B N を混合して、アルゴンガスを 20 分間溶液に通して泡立てた。混合物を 55℃ まで加熱して 15

分間重合させた。得られたポリマーを実施例 1 に記載したように単離した。下表に種々の実験の反応条件をまとめる。

バッチ番号	単量体濃度 (%W/V)	t-BuOH (cc)	A I B N (mg)	単量体(g)	概算平均 分子量*
R M 1 7	50	20.0	16	10	81kd
R M 1 8	50	60.0	50	30	107kd
R M 1 9	70	14.0	12	10	99kd
R M 2 1	70	72.0	60	50	112kd

\*ゲル浸透クロマトグラフィーによる概算値 (peak mol. wt.).

## 実施例 3

### 種々のポリ (ジメチルアクリルアミド) 溶液による

#### テスト系の電気浸透流の変化

テスト系の電気浸透流でのPDMAの種々の配合の効果を測定した。このテスト系は次の方法で形成されるアプライド・バイオシステムズ・モデル270HTキャピラリー電気泳動機器からなる：全長が40cm、検出器（UV）まで20cm、内径が75 $\mu$ mのコーティングされていない溶融シリカキャピラリーを設置し；分離媒質は添加されるテストPDMAポリマーと共に0.1Mのグリシルグリシン緩衝液（pH8.0）からなり；マーカー溶液は0.92mMのメシチルオキシドがらなり；上記のように動電学的装填後に10kVで30℃にて電気泳動を行った。

<u>PDMA</u>	<u>濃度</u>	<u>電気浸透流*</u>
RM 8	0.1% (W:v)	$7.38 \times 10^{-5}$
RM 16	0.1% (W:v)	$2.73 \times 10^{-5}$
RM 18**	0.01% (W:v)	$1.98 \times 10^{-5}$

\*  $\text{cm}^2/\text{sec-volts}$

\*\* p-TSA (1mM in H<sub>2</sub>O) マーカーとして使用。

#### 実施例 4

0.1Mグリシルグリシン緩衝液中 3% RM 8 を使用する

100塩基対DNAラダーの電気泳動

0.1Mのグリシルグリシン緩衝液中 3% (W:v)のRM 8 PDMAポリマーを使用して市販の二本鎖DNAラダー(100bp DNAラダー、GIBCO-BRL)の成分を分離した。アプライド・バイオシステムズ・モデル270HTに全長が60cmで試料注入口から検出器までが40cmで内径が75 $\mu$ mのコーティングされていない溶融シリカキャピラリーを取りつけた。10kVと13 $\mu$ Aの下に30℃で電気泳動を行った。5kVと6 $\mu$ Aの下に5秒間動電学的に試料を注入した。分析物の電気泳動図（260nmでUV吸収を示す）を図2に示す。

#### 実施例 5

0.1Mグリシルグリシン緩衝液中 3% RM 18 を使用する

100塩基対DNAラダーの電気泳動

0.1Mのグリシルグリシン緩衝液 pH8.0中 3% (w:v)のRM 18 PDMAポリマーを使用して実施例4の二本鎖DNAラダーの成分を分離した。アプライド・バ

イオシステムズ・モデル270HTに全長が60cmで試料注入口から検出器までが40cmで内径が75 $\mu$ mのコーティングされていない溶融シリカキャピラリーを取りつけた。10kVと13 $\mu$ Aの下に30℃で電気泳動を行った。5kVと7 $\mu$ Aの下に5秒間動電学的に試料を注入した。分析物の電気泳動図(260nmでUV吸収を示す)を図3に示す。

#### 実施例 6

##### 90mMのTBE緩衝液中3%RM18を使用する

##### 100塩基対DNAラダーの電気泳動

90mMのTBE緩衝液pH8.3中3%(w:v)のRM18PDMAポリマーを使用して実施例4の二本鎖DNAラダーの成分を分離した。アプライド・バイオシステムズ・モデル270HTに全長が60cmで試料注入口から検出器までが40cmで内径が75 $\mu$ mのコーティングされていない溶融シリカキャピラリーを取りつけた。10kVと8 $\mu$ Aの下に30℃で電気泳動を行った。5kVと8 $\mu$ Aの下に5秒間動電学的に試料を注入した。分析物の電気泳動図(260nmでUV吸収を示す)を図4に示す。

#### 実施例 7

##### 0.1Mグリシルグリシン緩衝液中3%ポリアクリルアミドを使用し

##### 0.05%PDMA(RMI8)を使用しない100塩基対DNAラダーの電気泳動

0.1Mのグリシルグリシン緩衝液pH8.0中3%(w:v)の線状ポリアクリルアミド溶液を使用して実施例4の二本鎖DNAラダーの成分を分離した。アプライド・バイオシステムズ・モデル270HTに全長が60cmで試料注入口から検出器までが40cmで内径が75 $\mu$ mのコーティングされていない溶融シリカキャピラリーを取りつけた。10kVと17 $\mu$ Aの下に30℃で電気泳動を行った。5kVと8 $\mu$ Aの下に5秒間動電学的に試料を注入した。30分後にピークは検出されずラダー成分の分離がないことを示した。

使用したポリマー溶液が3%の線状ポリアクリルアミドと0.05%のPDMA(RM18)の混合物であった他は、同じ条件で2回目の分離を行った。分析物の電気泳動図(260nmでUV吸収を示す)を図5に示す。

#### 実施例 8

0.1Mグリシルグリシン緩衝液中ポリエチレンオキシドとポリ-N-ビニルピロリドンのポリマー溶液を使用する100塩基対DNAラダーの電気泳動

ポリ-N-ビニルピロリドン(PVP)(平均MW360kD)の3%(w:v)溶液とポリエチレンオキシド(PEO)(平均MW35kD)の5%(w:v)溶液を0.1Mグリシルグリシン緩衝液pH8.0中で調製した。異なるポリマー溶液を使用した他は実施例4~7に使用したものと同じ装置を使用し同じ条件下に6つの分離実験で実施例4のDNAラダーを電気泳動により分離した。完了した分離割合を示す図に関連して下表にポリマー溶液を列挙する。使用したポリ(ジメチルアクリルアミド)はRM18であった。

<u>ポリマー溶液</u>	<u>分離</u>	<u>図</u>
3% PVP	あり	6 A
6% PVP	あり	6 B
3% PVP + 0.5% PDMA	あり	6 C
5% PEO	なし	図なし
5% PEO + 0.5% PDMA	あり	6 D
0.5% PDMA	あり	6 E
5% PEO + 0.05% PDMA	あり	6 F

## 実施例9

キャピラリー電気泳動によるポリ(ジメチルアクリルアミド)中のDNA配列分析断片の分離

蛍光標識をつけたDNA配列分析断片をアプライド・バイオシステムズ・インコーポレイテッド(Foster City, CA)から入手した(使用した断片はアプライド・バイオシステムズのPart No.400993によって与えられる4色配列分析標準物、Taq DNA配列分析標準物をつくるために使用される“C”末端断片であった)。末端がジデオキシシチジンでありフルオレセインで標識を付けた断片(FAM-C断片)を含む混合物8 $\mu$ lを500 $\mu$ lの遠心分離チューブに加え穏和に加熱しながら急速真空で乾燥させた。0.5mlの50mMEDTA溶液と6mlの再結晶ホルム



アミドを乾燥したFAM-C断片に加えた後、混合物を95℃で2分間加熱して氷上に置いた。

電気泳動用の分離媒質を次のように調製した：20mlのメタノール、110mlの水および2.8gのトリスを混合し、次に85%リン酸で滴定しpH8.0にして貯蔵緩衝液を調製した。分離媒質は全量が約10mlとなるように3.6mlのストック緩衝液、3.6mlの水、4.8gの尿素、そして上記のように調製した0.65gのポリ(ジメチルアクリルアミド)(RM21)を混合して調製した。得られた混合物を3時間攪拌し0.45 $\mu$ mのシリンジフィルターに通して濾過した。

全長が54cmのコーティングしていない50 $\mu$ mの内径のポリマイクロテクノロジーの溶融シリカキャピラリー(Cat. No.2000017)を、注入口と検出帯との間が40cmとなるように調製した。最初の使用前に、キャピラリーを20カラム容量の1.0M NaOH、20カラム容量の水で洗い流し、次に分離媒質で充填した。同じキャピラリーを用いた次の行程では、使用前に、キャピラリーを20カラム容量の水、20カラム

容量のテトラヒドロフラン(THF)、20カラム容量の1M NaOH、20カラム容量の水で洗い流し、次に分離媒質で充填した。

電極とキャピラリー端部をできるだけ離して置くように注意しながら、25秒間0.69 $\mu$ Aにて1.8kVの下に動電学的にFAM-C断片試料をキャピラリーに装填した。この断片を4.41 $\mu$ Aにて220V/cmで分離した。試料注入と電気泳動は22℃で行った。1.5mWにて操作するアルゴンイオンレーザー(モデル221-40MLA, Cyonics, San Jose, CA)からの励起ビームを用いて検出窓で断片バンドを照射した。励起ビームを0.5光学密度中和密度フィルター(#FNG 085, Melles Groit, Irvine, CA)を通して焦点距離が64mmで直径が7mmのポジティブレンズと焦点距離が85mmで直径が5mmのネガティブレンズからなる一組の焦点調節オプティクスに通し、キャピラリー検出窓に約100 $\mu$ mのビーム直径で集束させた。蛍光発光は焦点距離が12mmで直径が14mmの非球面のコレクターレンズによって直角に集め、530nmのRDFバンドパスフィルター(Omega Optical, Brattleboro, VT)を通して焦点距離が48mmで直径が19mmの非球面ファブリイレンズに次に焦点距離が17mmで直径が10mmの非球面ファブリイレンズからなる一組のファブリイに通した。次いで

検出するため光電子増倍管(#R98-21, Hamamatsu, San Jose, CA)に光を映した。分離した断片の電気泳動図を図7A-7Jに示す。ピーク近くの数字は断片の大きさを示す。

#### 実施例 10

##### キャピラリー電気泳動による

##### ポリ (ジメチルアクリルアミド) の4色DNA配列分析

蛍光により標識をつけたDNA配列分析断片はアプライド・バイオシステムズ (Foster City, CA) (Part No.400993, Taq DNA配列分析標準物) から得た。乾燥した配列分析標準物に、水-ピロリドン (75:25(vol:vol)) 溶媒に溶解した0.15%ヒドロキシエチルセルロース(QP100MH Union Carbide)から作った試料装填試薬 $30\mu\text{l}$ を添加した。次いで試料をふたつの $15\mu\text{l}$ アリコートに分けて、2分間 $95^{\circ}\text{C}$ で加熱し、氷上に置いた。

分離媒質は、上記のように調製した0.65gのポリ (ジメチルアクリルアミド)

(RM21)と4.8gの尿素を $1.0\text{ml}$ の $1.0\text{M}$  TAPS(N-トリス [ヒドロキシメチル] メチルー 3-アミノプロパンスルホン酸)、 $\text{pH} 8.0$ および $6.2\text{ml}$ の水の溶液に溶解して調製した。ポリマー溶液を夜通し攪拌し、次いで $0.45\mu\text{m}$ のシリンジフィルターを通して濾過した。最終ポリマー溶液の粘度は、約 $50\text{rpm}$ の速度でスピンドル#00を使用するブルックフィールド粘度計モデルDV-II (Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA)で測定すると $25^{\circ}\text{C}$ で約 $75\text{cp}$ であった。

注入口と検出ゾーンとの間が $40\text{cm}$ となるように全長が $51\text{cm}$ のコーティングしてない内径が $50\mu\text{m}$ の溶融シリカキャピラリー (Polymicro Technologies, Tucson, AZ Cat. No.2000017) を用意した。最初の使用の前に、キャピラリーを20カラム容量以上の水、20カラム容量以上の $0.1\text{M}$  NaOH、次に20カラム容量以上の水で洗い流し、次に分離媒質で充填した。

ここで使用する4色検出装置はDNA分析の技術で良く知られている装置に似たものであるが、本発明の決定的な特徴ではない、例えばKarger et al., Nucleic Acids Research 19(18): 4955-62 (1991)。この4色検出装置は $488$ と $514\text{nm}$ の波長で発光する蛍光励起光源としてアルゴンイオンレーザーを使用する。代表的

にはレーザーは9.9mWの全レーザー力で操作した。レーザー光はバンドパスフィルターを通過してレーザーチューブのカソードグローを移動させ、フィルターを通過する光の波長は約485nmと515nmとの間である。次に、平凸のレンズは光線を発散させ、このレンズは焦点距離が100mmで直径が8mmである、例えば、(Melles Griot part no.01LPK041/078(Melles Griot, Irvine, CA)。次いでレーザー光は波長が約485nmと515nmの間の光を通す二色性の鏡を通過し、次に顕微鏡目標物を通過し、分離キャピラリーの検出領域に入る。放射光は二色性の鏡から反射して分光器に向けられる。分光器に入る散乱レーザー光の量を減らすため、放射光はカットオフが約520nmのロングパスフィルターを通過し、次いで焦点距離が85mmの再映像レンズによって分光器の入口スリットに焦点を合わせる、例えば、Melles Griot part no.01LPK035。分光器は17nm/mmの分散をもつ405g/mmの450nm閃光回折格子を使用する。分光器を通過した後、次に光は帯電連結デバイス検出器(CCD)に入る。CCDからの出力信号は次のデーター分析と提示のために電算機に伝送される。データー分析に使用されるソフトウェアはSe

quencing Analysis バージョン2.1.0B1であり、これは市販品で使用される配列分析のソフトウェア (Applied Biosystems Model 373 DNA Sequencer) に似ており、その基本的計算法は一般にいずれかに記載されている、例えば、Smith et al, Methods in Enzymology Vol. 155 260-301頁、Academic Press (1991)。

試料は25秒間60V/cmの電場を用いるキャピラリーに動電学的に装填した。断片は42℃の温度で3.0 $\mu$ Aにて160V/cmの電場の下で分離した。行程は約2時間で行われた。

得られた電気泳動図は図8に示される。

#### 実施例 11

##### キャピラリー電気泳動による

##### ポリビニルピロリドン中の4色DNA配列分析

分離媒質は、1.0mlの1.0MTAPS(N-トリス〔ヒドロキシメチル〕メチル-3-アミノプロパンスルホン酸), pH8.0の溶液および6.2mlの水に1.0gのポリビニルピロリドン(Povidone, United States Pharmacopia, BASF, Kollidon 90F)

および4.8gの尿素を溶解して調製した。ポリマー溶液を夜通し攪拌し、次に0.45  $\mu\text{m}$ のシリンジフィルターに通して濾過した。

DNA配列分析断片、断片試料調製、電気泳動キャピラリー、4色検出装置、試料注入プロトコル、および電気泳動行程条件はすべて基本的に実施例10で用いたものと同じであった

得られた電気泳動図は図9に示される。

図9に示されるデータには染料移動度の補正はしなかった。DNA配列分析伸長生成物に蛍光染料を添加すると会合したDNA断片の電気泳動移動度が変わるから、そして異なる染料が異なる移動度のシフトの原因となるから、“移動度の補正”は異なる染料を含む断片の電気泳動移動度を標準化するために必要である。図9のデータはこれらの移動度のシフトを補正していないので、ピークの程度はいくらか偏っている。しかしながら、隣接する断片の必須の分解能はポリビニルピロリドン物質を用いて得られたことが認められる。

【図1】

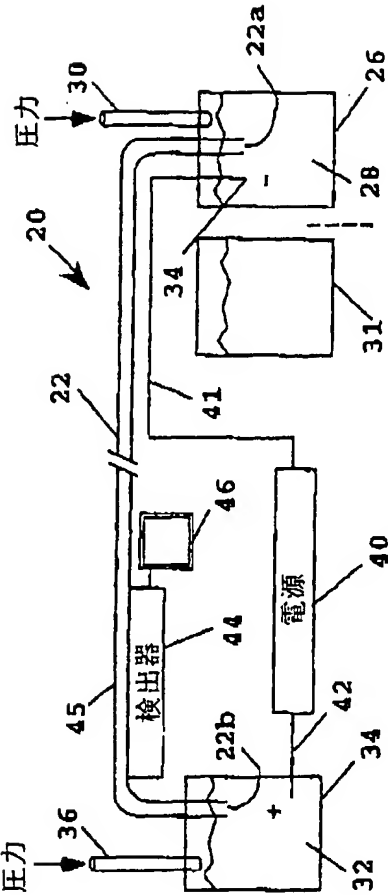


Fig. 1

【図2】

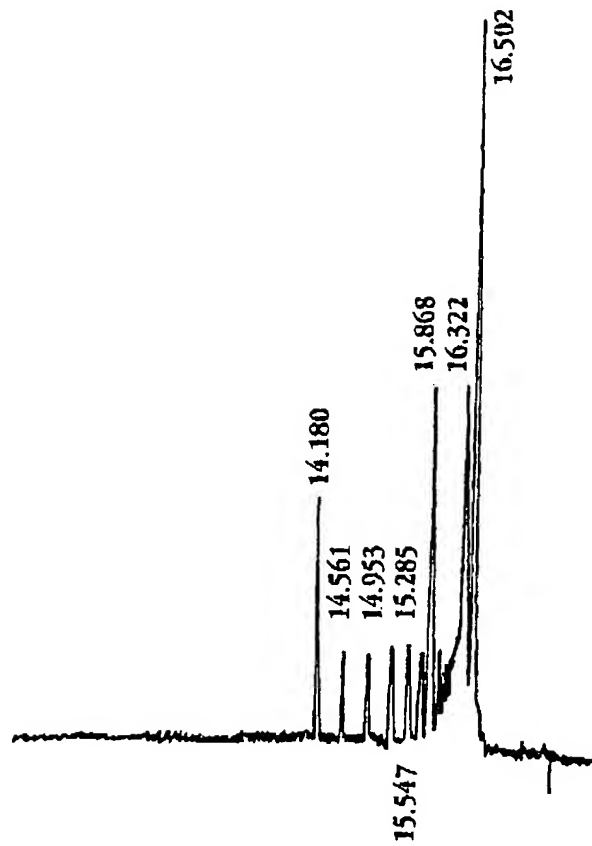


Fig. 2

【図3】

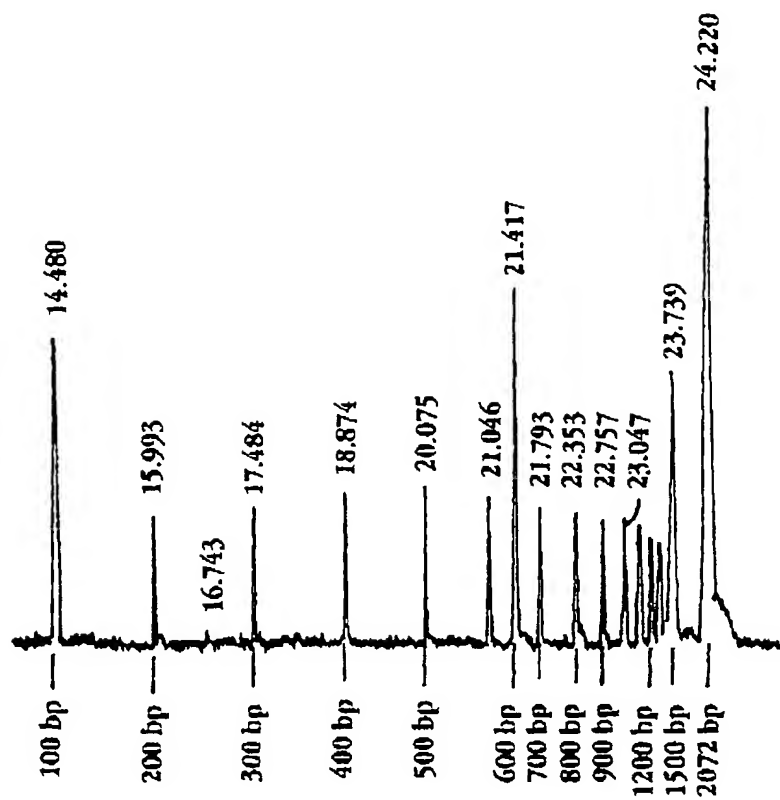


Fig. 3

【图4】

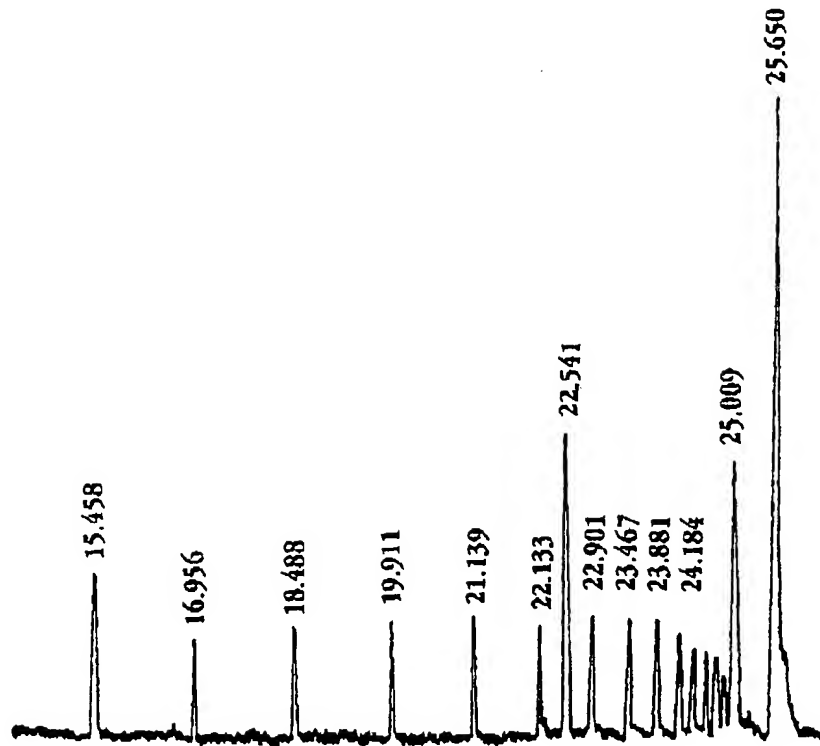


Fig. 4



【図5】

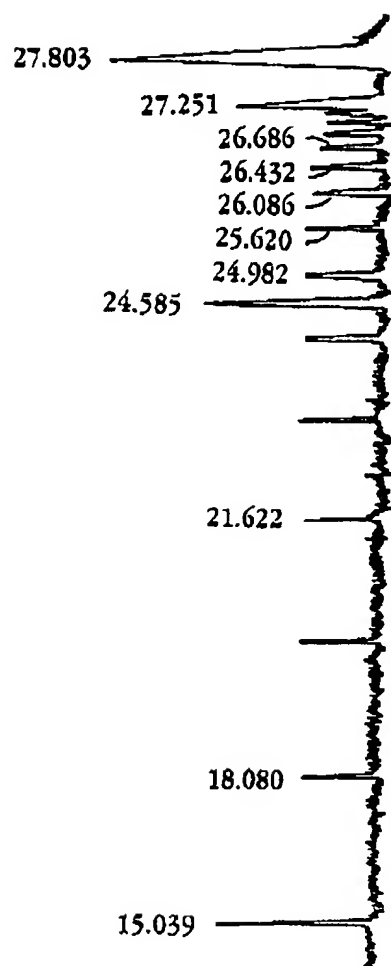


Fig. 5

【图6】

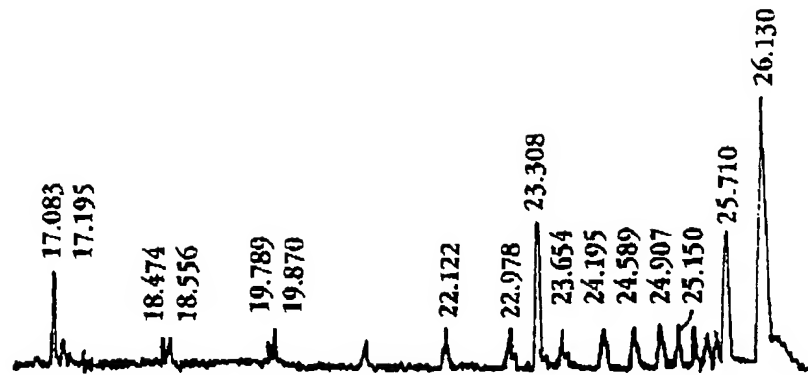


Fig. 6A

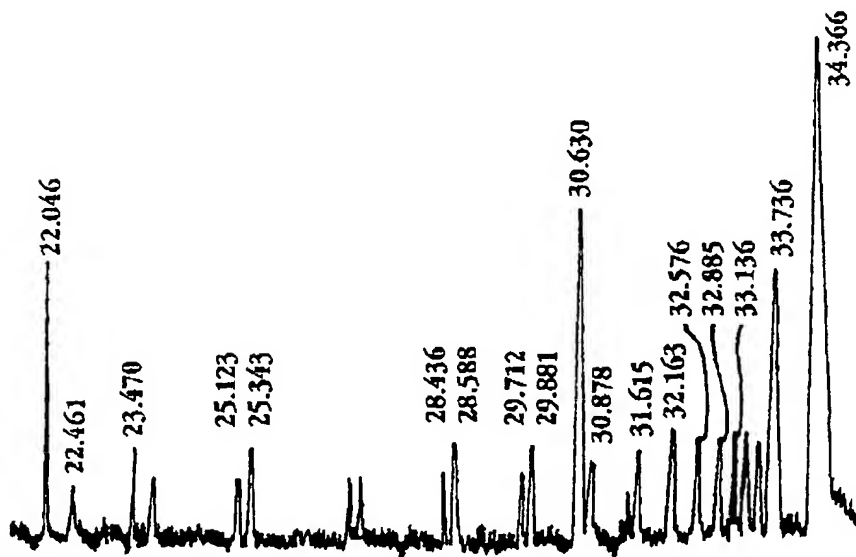


Fig. 6B

【图6】

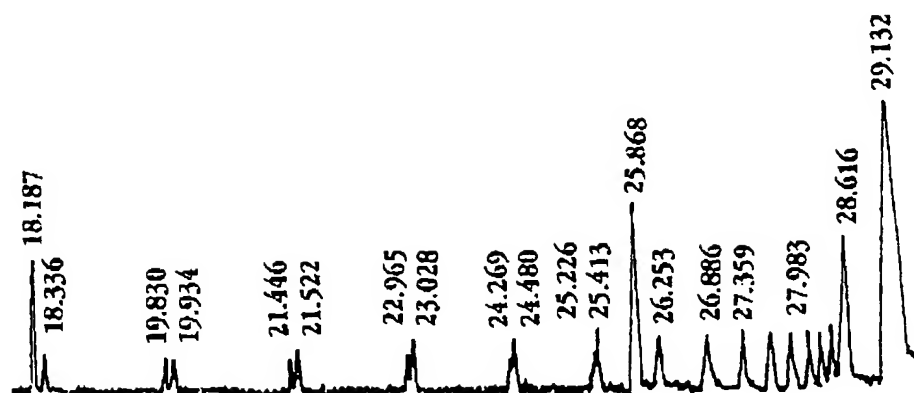


Fig. 6C

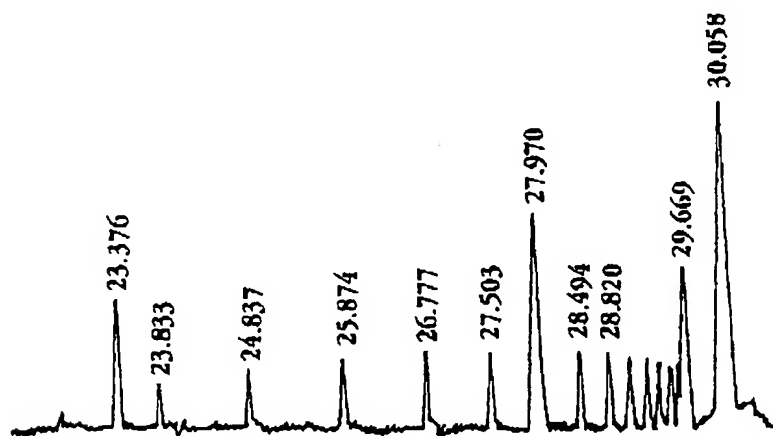


Fig. 6D

【图6】

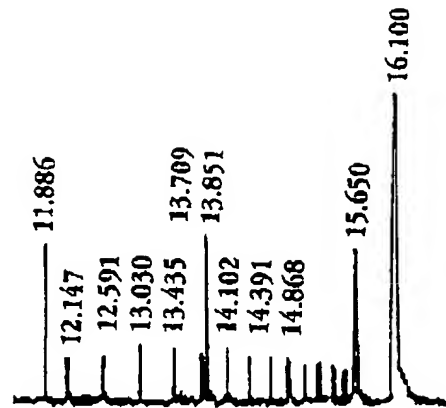


Fig. 6E

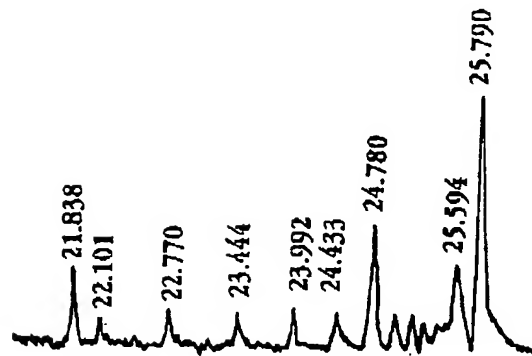


Fig. 6F

【図7】

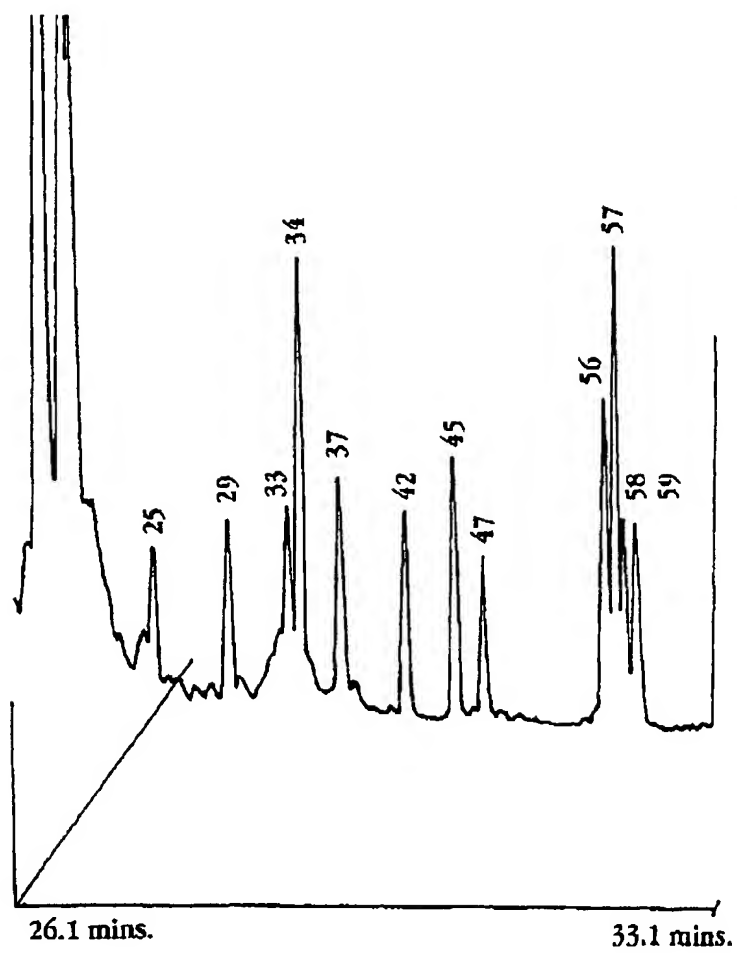


Fig. 7A

【图7】

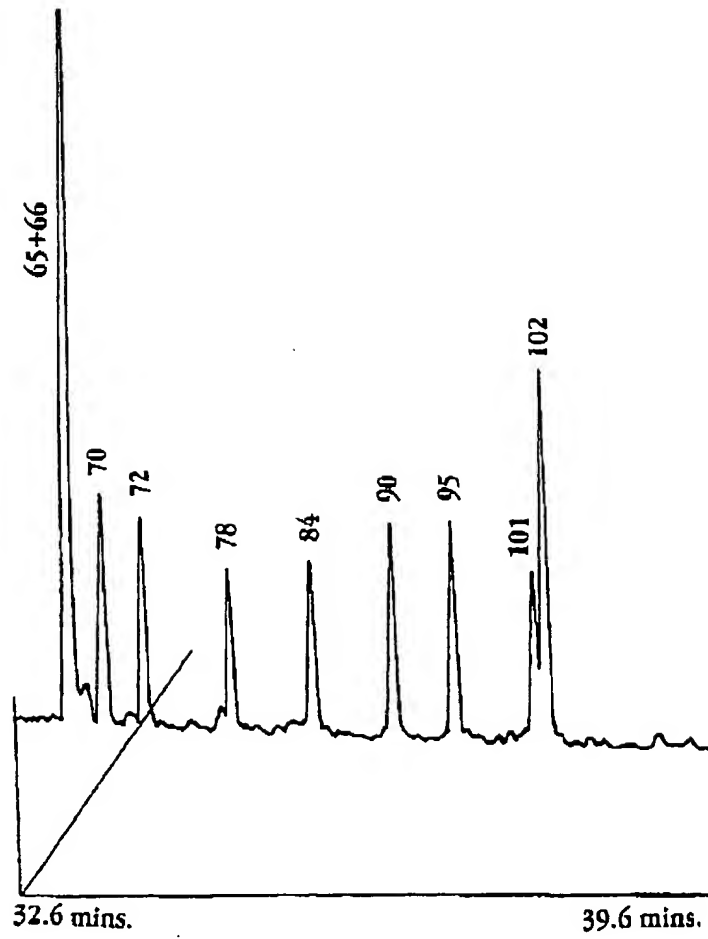


Fig. 7B

【図7】

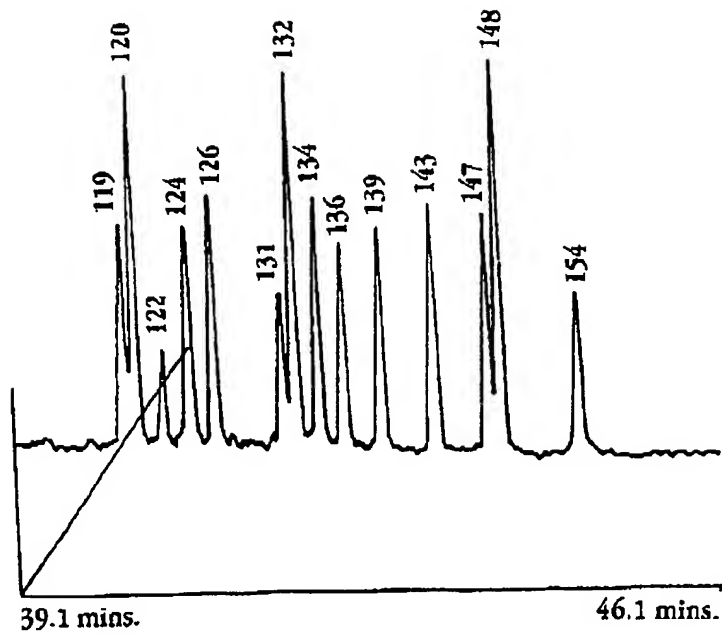


Fig. 7C

【図7】

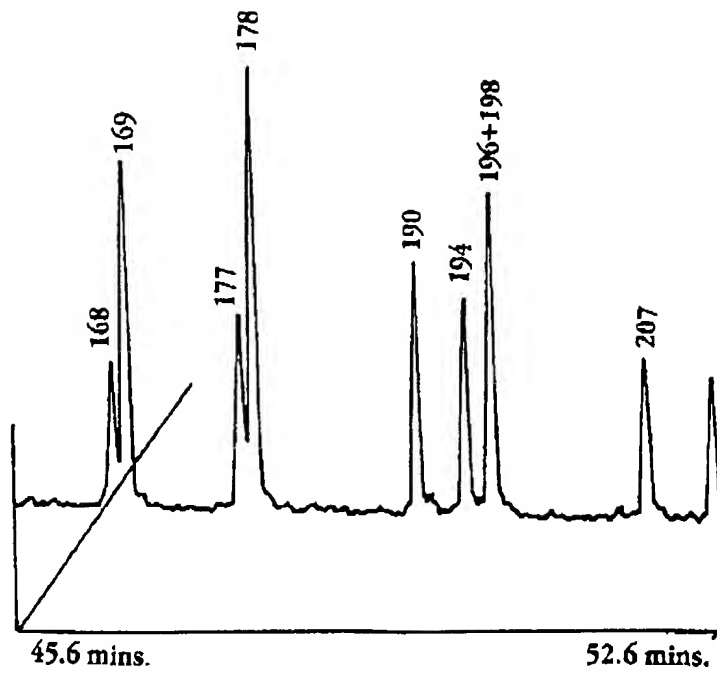


Fig. 7D



【図7】

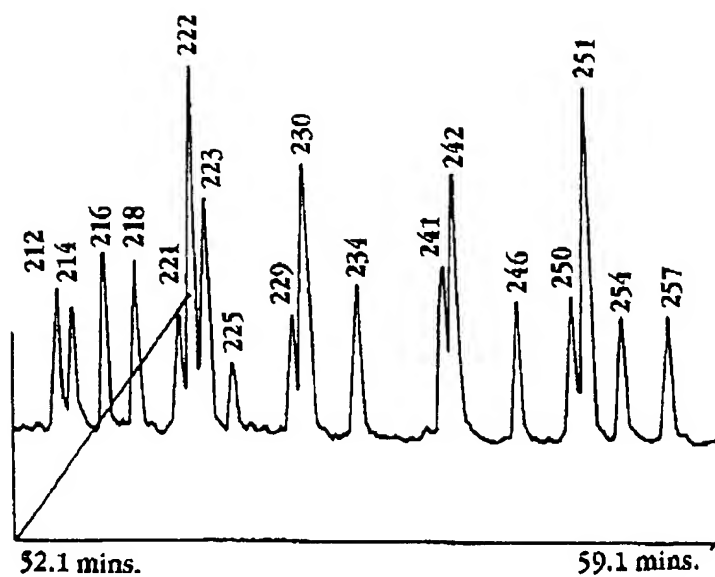


Fig. 7E

【図7】

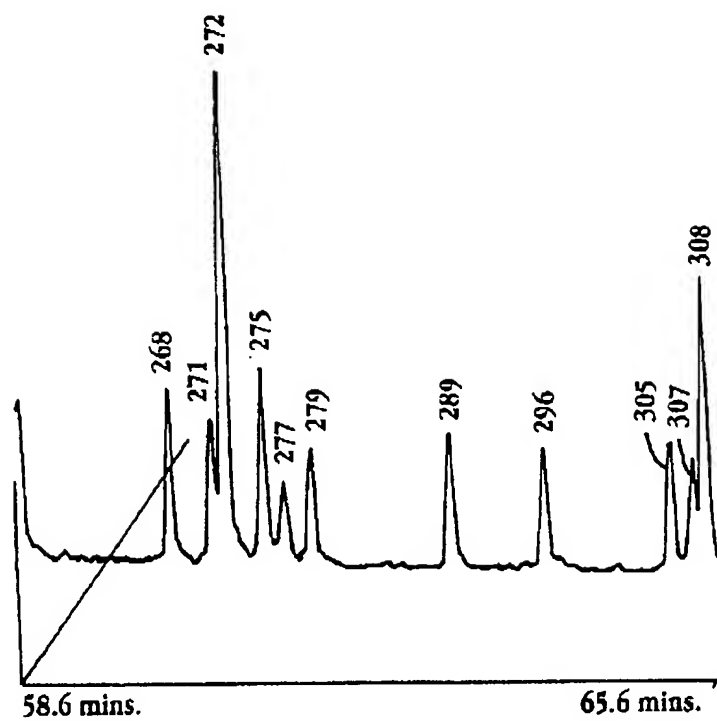


Fig. 7F

【图7】

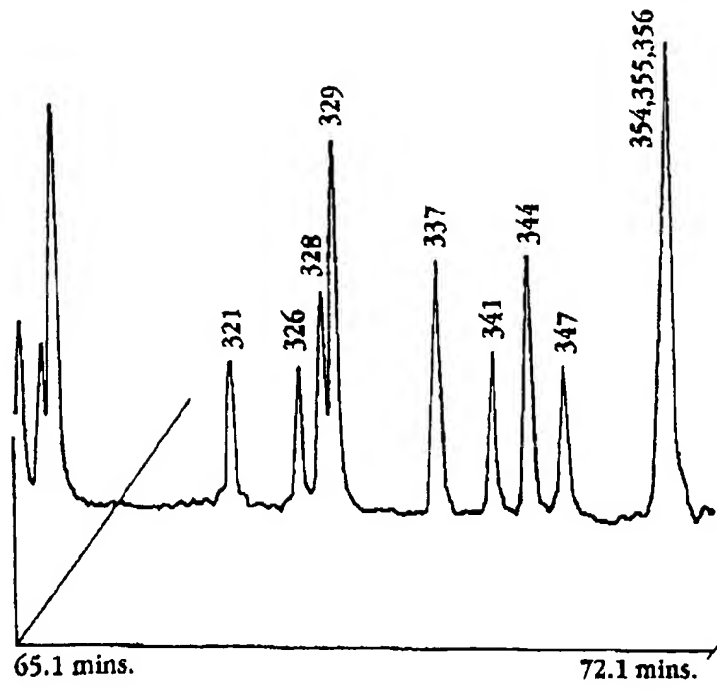


Fig. 7G

【図7】

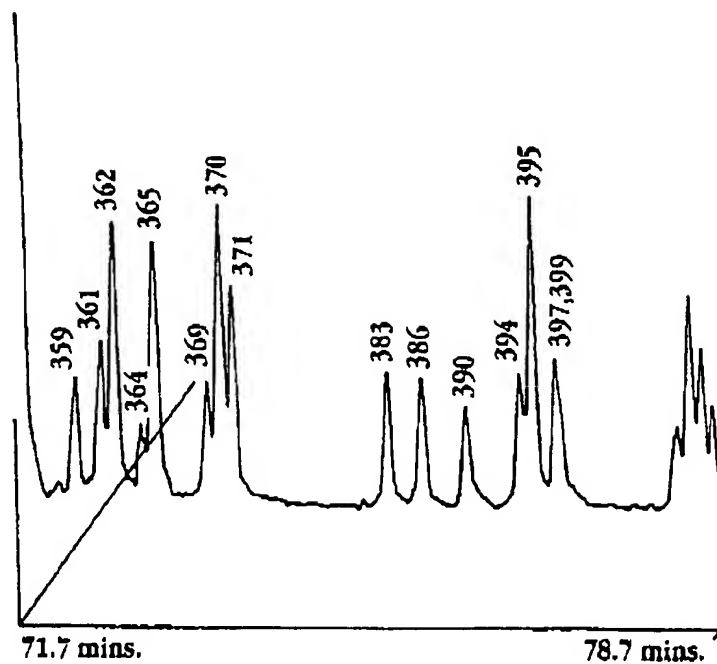


Fig. 7H

【図7】

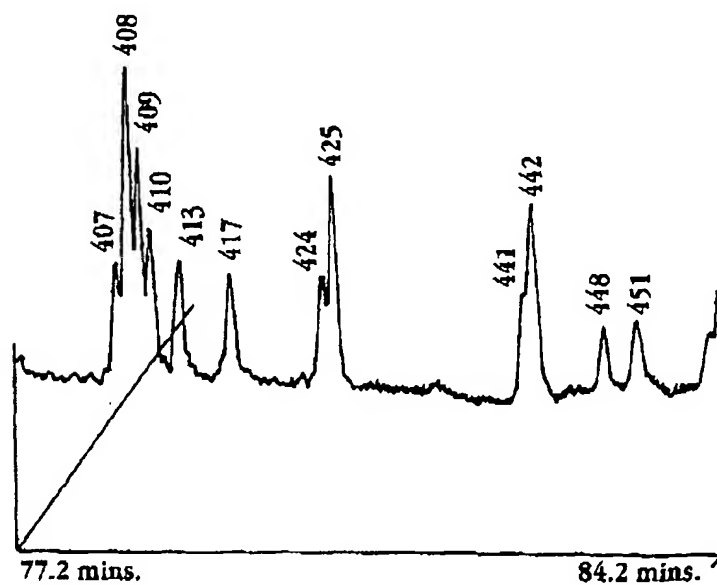


Fig. 7I

【图7】

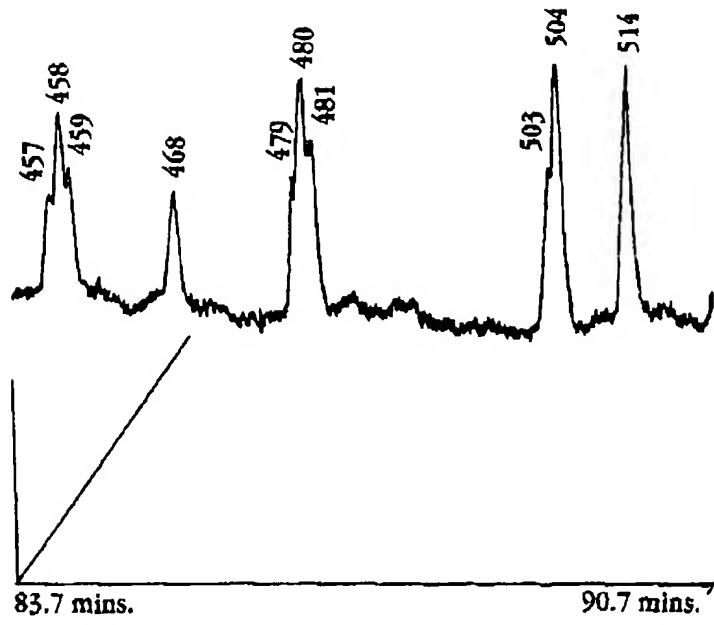


Fig. 7J

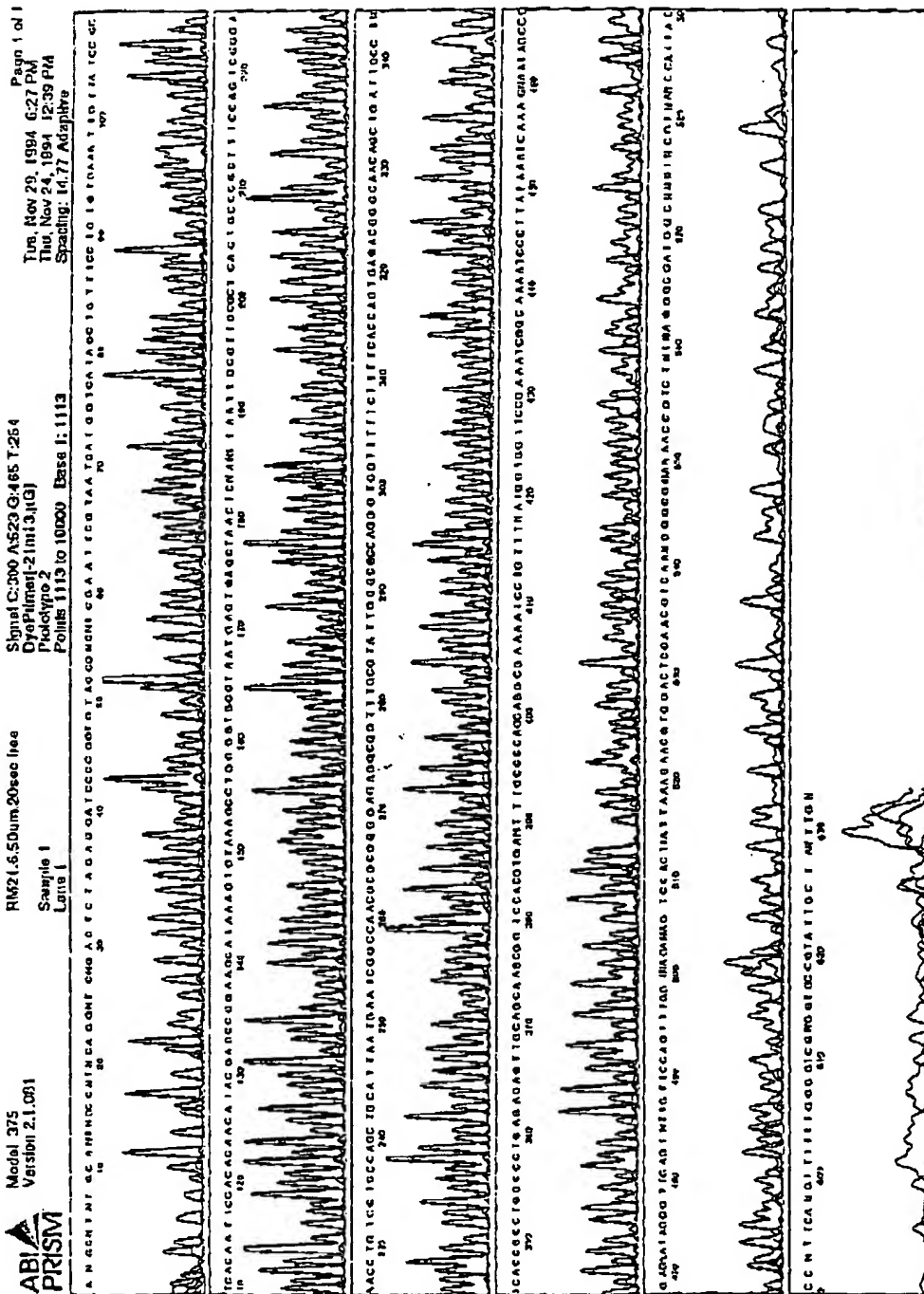


Fig. 8

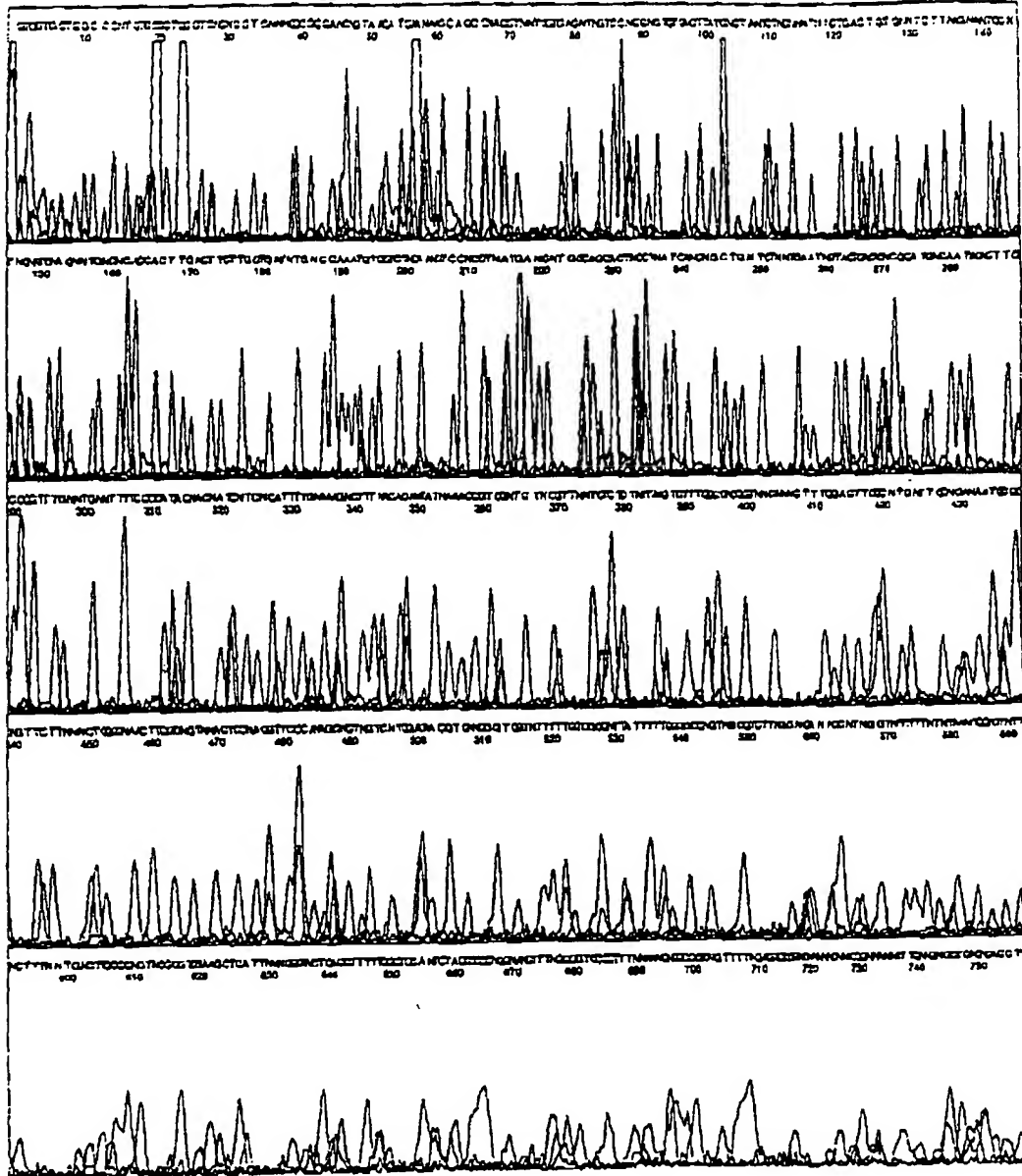
【図9】



Model 375 10%PVP,2.50um,10sec  
Version 2.1.068kd7μS  
10%PVP,2.50um,10sec  
Line 1

Signal C:93 A:108 G:67 T:44  
DyePrimer(-21m13.μG)  
Prototype 2  
Points 1686 to 2000C Base 1: 1686

Page 1 of 1  
Tue, Dec 6, 1994 10:40 AM  
Mon, Nov 23, 1994 9:05 PM



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intern: Application No PCT/US 94/13852
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N27/447		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US,A,4 963 243 (M. OGAWA) 16 October 1990 see column 3, line 15 - line 20 ---	1
Y	US,A,5 264 101 (D. M. DEMOREST) 23 November 1993 see abstract ---	1
A	US,A,5 015 350 (J. E. WIKTOROWICZ) 14 May 1991 see column 2, line 39 - line 64 ---	1
A	GB,A,1 121 449 (BAUSCH & LOMB INC.) 24 July 1968 see page 1, line 44 - line 53 ---	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "d" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  15 March 1995		Date of mailing of the international search report  06.04.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 631 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Duchatellier, M



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Intern Application No  
 PCT/US 94/13852

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.19, no.18, 1991 pages 4955 - 4962 A. KARGER 'MULTIWAVELENGTH FLUORESCENCE DETECTION FOR DNA SEQUENCING USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS' cited in the application see the whole document ---	1
A	FR,A,2 448 553 (FMC CORP.) 5 September 1980 see claim 1 -----	1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
 information on patent family members

 Intern: Application No  
**PCT/US 94/13852**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4963243	16-10-90	JP-B- 1059543	18-12-89
		JP-C- 1567435	10-07-90
		JP-A- 59126236	20-07-84
		DE-A- 3466597	05-11-87
		EP-A, B 0116404	22-08-84
US-A-5264101	23-11-93	US-A- 5015350	14-05-91
		US-A- 5181999	26-01-93
		EP-A- 0638168	15-02-95
		WO-A- 9322665	11-11-93
		EP-A- 0500784	02-09-92
		JP-T- 5503989	24-06-93
		WO-A- 9106851	16-05-91
US-A-5015350	14-05-91	EP-A- 0500784	02-09-92
		JP-T- 5503989	24-06-93
		WO-A- 9106851	16-05-91
		US-A- 5181999	26-01-93
		US-A- 5264101	23-11-93
GB-A-1121449		NONE	
FR-A-2448553	05-09-80	US-A- 4290911	22-09-81
		CA-A- 1140833	08-02-83
		DE-A, C 3004526	21-08-80
		GB-A, B 2042571	24-09-80
		JP-C- 1364718	09-02-87
		JP-A- 55110946	27-08-80
		JP-B- 61029664	08-07-86
		SE-B- 449496	04-05-87
		SE-A- 8000966	08-08-80

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	
		0275-2J	G O I N 27/26	3 1 5 Z
		0275-2J		3 3 1 G
(72)発明者	メンチェン, スティーブン, エム			
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州			
	94536 フレモント, バンダ ウェイ 768			
(72)発明者	エフカビッチ, ジェイ, ウィリアム			
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州			
	94401 サン マテオ, バーム アベニュー			
	960 アパートメント #3			
(72)発明者	グロスマン, ボール, ディ			
	アメリカ合衆国 カリフォルニア州			
	94010 バーリンゲーム, ブルームフィー			
	ルド ロード 116			